Amersham™
ECL Select™ Réactif de détection pour transfert de type Western

Brochure du produit

Code : RPN2235



Sommaire

1. Mentions légales

Amersham ECL Select est fabriqué et vendu sous licence Cyanagen Srl et fait l'objet des demandes de brevets aux États-Unis, au Canada et dans l'Union Européenne sous les numéros US7803573 ; EP1962095 ; US7855287 ; EP1950207 US2012009603(A1) ; CA2742025 ; EP2405016, ainsi que d'autres brevets délivrés et demandes de brevets équivalents dans d'autres pays.

Première publication : février 2006

Tous les biens et les services sont vendus selon les conditions générales de vente de l'entreprise de GE Healthcare qui les fournit. Une copie des ces conditions générales est disponible sur demande. Contactez votre représentant local GE Healthcare pour obtenir les informations les plus récentes.

http://www.gelifesciences.com/ecl

GE Healthcare UK Limited.
Amersham Place, Little Chalfont,
Buckinghamshire, HP7 9NA UK

2. Description

Amersham™ ECL Select™ Le réactif de détection pour transfert de type Western de GE Healthcare apporte une sensibilité très élevée à la détection par chimiluminescence des antigènes spécifiques immobilisés conjugués à des anticorps marqués par la peroxydase de raifort (HRP).

2.1 Introduction

La chimiluminescence est définie comme une émission lumineuses produite lors d'une réaction à étapes multiples dans laquelle la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol. En présence d'amplificateurs chimiques et de catalyseurs, l'intensité du rayonnement et la durée de l'émission lumineuse sont fortement accrus par un processus appelé chimiluminescence améliorée (ECL). L'ECL basée sur des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) et une méthode de détection sensible dans laquelle l'émission lumineuse est proportionnelle à la quantité de protéine. La réaction à étapes multiples est présentée ci-dessous.

luminol

peroxyde

HRP, amplificateur

anion du radical luminol

peroxyde

luminol endoperoxyde

Aminophtalate + N¬2

+ émission lumineuse

2.2 Conception et caractéristiques

Le réactif de détection Amersham ECL Select est conçu pour fournir une émission lumineuse très élevée. Cela signifie que des quantités de protéines moyennes à très faibles (faibles concentrations, de l'ordre du picogramme) peuvent être détectées à l'aide d'anticorps hautement dilués. Ceci fait du Amersham ECL Select un produit adapté aux transferts de type Western les plus exigeants en matière de sensibilité. L'intensité élevée du signal peut totalement bénéficier des avantages de l'équipement d'imagerie basé sur une caméra CCD et fait de Amersham ECL Select un outil optimal de détection sur les systèmes ImageQuant™ LAS de GE Healthcare. L'émission lumineuse peut aussi être détectée à l'aide d'un film radiographique (gamme de produits Amersham Hyperfilm™).

2.3 Compatibilité

Le réactif de détection Amersham ECL Select est compatible avec les membranes en PVDF et en nitrocellulose (comme les gammes de produits Amersham Hybond™ et Amersham Protran), l'agent de saturation Amersham ECL Prime, l'agent de saturation Amersham ECL et les autres agents de saturation couramment utilisés comme le BSA et l'extrait sec dégraissé de lait.

3. Informations importantes pour l'utilisateur

3.1 Domaine d'utilisation

Le réactif de détection Amersham ECL Select est destiné à la détection par chimiluminescence lors des transferts de type Western.
Le réactif de détection Amersham ECL Select est uniquement destiné à la recherche et ne peut être utilisé dans le cadre d'interventions cliniques ou à des fins de diagnostic.

3.2 Avis de sécurité

Cette documentation de l'utilisateur contient des MISES EN GARDE concernant l'utilisation du réactif de détection Amersham ECL Select en toute sécurité. Voir les définitions ci-dessous.

Mises en garde



MISE EN GARDE

MISE EN GARDE Indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait provoquer des blessures mineures ou modérées. Il est important de ne rien entreprendre tant que toutes les conditions indiquées ne sont pas remplies, ni clairement comprises.

3.3 Contrôle qualité

Le réactif de détection Amersham ECL Select est fabriqué conformément à notre système de gestion de la qualité certifié ISO 9001 et il est conforme aux critères d'acceptation définis pour le produit.

4. Manipulation

4.1 Précautions de sécurité



MISE EN GARDE

Substances dangereuses. Lors de l'utilisation de produits chimiques dangereux, prenez toutes les mesures de protection convenables, comme le port de lunettes et de gants de protection, résistants aux substances utilisées. Respectez les réglementations locales et/ou nationales pour un fonctionnement sûr.

Il est recommandé de lire la Fiche technique santé-sécurité (SDS) avant utilisation Réactif de détection Amersham ECL Select.

4.2 Stockage

À réception, tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 8 °C. Le réactif de détection Amersham ECL Select est sensible à une exposition prolongée à la lumière. Stockez toujours les réactifs individuels dans les récipients étanches à la lumière dans lesquels ils ont été fournis.

4.3 Péremption

Les composants sont stables pendant au moins 3 mois quand ils sont stockés dans les conditions recommandées. Voir la date de péremption inscrite sur le conditionnement.

5. Composants requis

5.1 Composants du kit

Les composants suivants sont inclus dans le kit du réactif de détection Amersham ECL Select.

Produit	Contenu
RPN2235	• Solution A : Solution de luminol, 50 ml. • Solution B : Solution de peroxyde, 50 ml. Suffisante pour 1000 cm^2 de membrane

5.2 Solutions

Les solutions requises sont répertoriées ci-dessous.

- Tampon phosphate salin (PBS), pH 7,5
- Tampon Tris (PBS), pH 7,6
- Tampons de dilution et de lavage : PBS Tween™ (PBS-T) et TBS Tween (TBS-T). Une concentration de 0,1 % de Tween 20 convient à la plupart des applications de buvardage.

5.3 Membrane

Utilisez un protocole convenable pour séparer les protéines par électrophorèse et les transférer vers une membrane en PVDF ou en nitrocellulose.

5.4 Réactifs de saturation

Les réactifs de saturation sont en général dilués de 2 à 5 % (v/v) dans un tampon PBS-T ou TBS-T. Les réactifs de saturation suivants sont recommandés :

- Amersham ECL Prime Agent de saturation
- Amersham ECL Agent de saturation
- Extrait sec dégraissé de lait
- Albumine sérique bovine (BSA)

5.5 Réactifs d'immunodétection

- Anticorps primaire spécifique de la(des) protéine(s) cible(s)
- Anticorps secondaire conjugué à la HRP spécifique de l'anticorps primaire. *Voir les anticorps secondaires liés à la HRP pour ECL, en page 33.*

Diluez les anticorps dans du PBS-T ou du TBS-T selon les recommandations de *Gammes de dilution, en page 22*.

6. Optimisation du transfert de type Western

Introduction

Pour obtenir des résultats optimaux lors d'un transfert de type Western avec un un rapport signal-bruit élevé et la meilleure sensibilité et linéarité possible, il est important d'optimiser la méthode et de sélectionner les produits compatibles.

Considérez les éléments suivants :

- **Qualité de l'échantillon et quantité en chargement** – Il est important que l'échantillon soit de bonne qualité et que des niveaux détectables de la protéine cible soient présents.
- **Membrane et saturation** – Sélectionnez des membranes et des agents de saturation compatibles avec l'échantillon et les anticorps.
- **Anticorps primaire et secondaire** – Sélectionnez toujours des anticorps spécifiques de grande qualité et optimisez la dilution de l'anticorps.
- **Détection et imagerie** – Sélectionnez le réactif de détection en fonction des besoins de votre application. Un imageur CCD offre une sensibilité élevée et une vaste plage dynamique, il permet une meilleure quantification qu'un film radiographique.

Ce chapitre décrit les produits dont l'utilisation est recommandée avec le réactif de détection Amersham ECL Select. Pour plus d'informations concernant ces produits, consultez www.gelifesciences.com/ecl.

6.1 Marqueurs de masse moléculaire

Les marqueurs de masse moléculaire sont utilisés pour déterminer la taille des protéines. De plus, les marqueurs précolorés permettent la confirmation du transfert et de l'orientation des protéines (par le transfert des bandes colorées vers la membrane).

- **Les marqueurs Amersham Rainbow™** sont des marqueurs multicolores précolorés pour la surveillance de la progression de l'électrophorèse des protéines, la confirmation de l'efficacité du transfert et la détermination de la masse moléculaire des protéines transférées.
- **Les marqueurs Amersham ECL DualVue™** sont optimisés pour une utilisation avec Amersham ECL, Amersham ECL Prime et Amersham ECL Select et contiennent une combinaison de marqueurs protéiques marqués et pré-colorés. Ces marqueurs permettent la surveillance de l'électrophorèse, la confirmation de l'efficacité du transfert et la détermination de la masse moléculaire des protéines transférées sans coloration sur le gel et la membrane, ainsi que la détection par chimiluminescence.

6.2 Membranes

- **Amersham Hybond** est une membrane en PVDF dotée de capacité de liaison aux protéines et d'une résistance mécanique élevées, qui en font l'outil idéal pour les applications de transfert de type Western quand décollement et réhybridation sont nécessaires. L'utilisation de la membrane est optimale avec les réactifs de détection Amersham ECL Prime et ECL Select.
- **Amersham Protran** est une membrane en nitrocellulose compatible avec tous les substrats de transfert de type Western chimiluminescents. Son principalement avantage réside dans son arrière-plan normalement faible.

6.3 Transfert

- **Le transfert humide** (Unité de transfert TE 22), est la méthode de transfert la plus couramment utilisée. Elle permet le transfert efficace de protéines petites ou grosses.
- **Le transfert semi-humide** (Unités de transfert TE 70 et TE 77) est plus rapide que le transfert humide et consomme moins de tampon. Le transfert semi-humide fonctionne bien pour la plupart des protéines mais il peut être moins efficace pour les grosses protéines. Il est susceptible d'avoir une sensibilité réduire pour les très faibles abondances protéiques.

6.4 Saturation

Après transfert des protéines, la membrane doit être incubée dans une solution de saturation pour empêcher la liaison non spécifique d'anticorps, susceptible être responsable de l'apparition d'un arrière-plan et de bandes non spécifiques sur le buvard. L'agent de saturation doit être optimisé pour obtenir les meilleurs résultats ; aucun agent de saturation seul ne peut être optimal pour toutes les protéines et tous les anticorps. GE Healthcare recommande les agents de saturation suivants, compatibles avec Amersham ECL, Amersham ECL Prime et Amersham ECL Select :

- **Amersham ECL Prime Agent de saturation**
- **Amersham ECL Agent de saturation**
- **Agent de saturation BSA**
- **Extrait sec dégraissé de lait**

6.5 Imageurs et films

Les systèmes ImageQuant LAS sont des systèmes flexibles qui couvrent une vaste gamme d'applications d'imagerie. Ces imageurs basés sur des CCD constituent une option abordable pour la détection des protéines avec de véritables avantages en matière de quantification à haute sensibilité, données prêtes à la publication et archivage des données.



ImageQuant LAS 500

La gamme de produits Amersham Hyperfilm est constituée de produits faibles pour une détection par chimiluminescence sensible et qualitative lors des transferts de type Western.

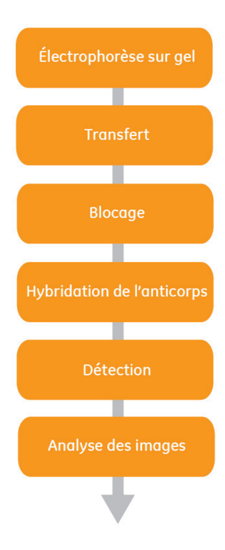
6.6 Manuel du transfert de type Western

Vous trouverez plus d'aide technique, de conseils et de bonnes pratiques dans le manuel Principes et méthodes du transfert de type Western de GE Healthcare (n° de code 28-9998-97).

7. Protocole

Présentation du protocole

Ci-dessous une présentation du protocole de détection d'un transfert de type Western.



7.1 Électrophorèse et transfert

Étape	Action
1.	Effectuez l'électrophorèse et transférez les protéines vers une membrane convenable selon les protocoles de transfert. Les buvards peuvent être utilisés immédiatement ou conservés dans du PBS-T ou du TBS-T entre 2 et 8 °C. ***Remarque :*** *La membrane Amersham Hybond doit être mouillée au préalable de méthanol à 100 % avant équilibration dans le tampon de transfert.*

7.2 Saturation

Étape	Action
1.	Incubez la membrane dans une solution de saturation convenable sur un agitateur orbital pendant 1 heure à température ambiante ou toute une nuit entre 2 et 8 °C.
2.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage. ***Remarque :*** *Pour la préparation du tampon de lavage, voir Solutions, en page 9.*

7.3 Hybridation de l'anticorps

Le réactif de détection Amersham ECL Select permet une émission lumineuse très élevée et, de ce fait, des dilutions d'anticorps élevées. La dilution optimale varie entre les anticorps selon leur affinité et leur qualité.

L'optimisation de la dilution de l'anticorps peut être réalisées par analyse par transfert de taches (voir *Détermination de la concentration optimale en anticorps, en page 22*).

7.4 Gammes de dilution

Les gammes de dilution suivantes sont recommandées.

Anticorps	Gamme de dilution à partir d'une solution mère à 1 mg/ml
Primaire	1:5000 - 1:30000
Secondaire	1:100000 - 1:300000

Le tableau ci-dessous présente des suggestions de dilutions de départ d'anticorps primaires ayant des niveaux d'affinité différents.

Type d'anticorps	Anticorps primaire dilution	Anticorps secondaire dilution
Anticorps primaires ayant une affinité élevée	1:10000	1:150000
Anticorps primaires ayant une affinité moyenne à faible	1:5000	1:100000

7.5 Incubation de l'anticorps primaire

Étape	Action
1.	Diluez l'anticorps primaire dans du PBS-T ou du TBS-T.
2.	Incubez la membrane dans la solution d'anticorps primaire sur un agitateur orbital pendant 1 heure à température ambiante ou toute une nuit entre 2 et 8 °C.
3.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage.
4.	Lavez la membrane à 4 ou 6 reprises pendant 5 minutes dans du tampon de lavage à température ambiante sur un agitateur orbital. ***Remarque :*** *L'exposition au film radiographique nécessite 6 étapes de lavage, pour éviter l'arrière-plan.*

7.6 Incubation de l'anticorps secondaire

Étape	Action	Remarques
1.	Diluez l'anticorps secondaire (anticorps biotinylé ou conjugué à la HRP) dans du PBS-T ou du TBS-T.	Augmentez l'émission lumineuse en construisant un sandwich à trois couches à l'aide d'anticorps secondaires biotinylés et de streptavidine conjuguées à la HRP.
2.	Incubez la membrane dans la solution d'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur orbital.	
3.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage.	
4.	Lavez la membrane à 4 ou 6 reprises pendant 5 minutes dans du tampon de lavage à température ambiante sur un agitateur orbital.	L'exposition au film nécessite 6 étapes de lavage, pour éviter l'arrière-plan.

En cas d'utilisation d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP, passez directement *à l'étape de Détection*, en page 18.

En cas d'utilisation d'un anticorps biotinylé, passez au protocole d'incubationdu pont streptavidine au verso.

7.7 Incubation du pont streptavidine

Étape	Action
1.	Diluez le conjugué Streptavidine-HRP ou le complexe Streptavidine biotinylée-HRP dans du PBS-T ou du TBS-T.
2.	Incubez la membrane dans la solution diluée pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur orbital.
3.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage.
4.	Lavez la membrane en la remettant en suspension dans une quantité de tampon de lavage suffisante pour recouvrir la membrane et agitez pendant 5 minutes à température ambiante. Renouvelez le tampon de lavage à 4 ou 6 reprises, au minimum.

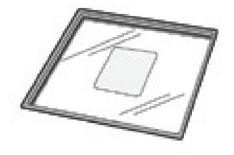
7.8 Détection

Étape	Action
1.	Laissez les solutions de détection s'équilibrer à température ambiante pendant 20 min.
2.	Mélangez les solutions de détection A (luminol) et B (peroxyde) dans un rapport de 1:1 pour donner une solution de travail. Le volume final de réactif de détection requis est de 0,1 ml/cm^2 de membrane. ***Remarque :*** *Si le réactif mélangé n'est pas utilisé immédiatement, tenez-le à l'abri de l'exposition à la lumière en l'enveloppant dans une feuille ou en le conservant dans un lieu sombre.*
3.	Éliminez le tampon de lavage en excès de la membrane lavée et placez-la, côté protéines orienté vers le haut, dans une boîte appropriée ou sur un feuillet de film en plastique ou toute autre surface propre convenable. Ajoutez le réactif de détection sur la membrane et vérifiez qu'il la recouvre complètement.
4.	Incubez pendant 5 minutes à température ambiante.
5.	Éliminez le tampon de détection en excès en tenant délicatement la membrane par les bords contre un tissu.

7.9 Analyse de l'image

Deux protocoles d'analyse d'image sont décrits, un pour l'imagerie fondée sur la caméra CCD et l'autre employant un film radiographique.

7.10 Caméra CCD

Étape	Action	Remarques
1.	Placez le buvardage, côté protéines orienté ver le haut, sur un plateau d'échantillons. 	Le buvardage peut être placé sur un pièce de film plastique, côté protéines orienté vers le haut, afin de faciliter un déplacement facile du film sur le plateau d'échantillons.
2.	Placez le plateau d'échantillons dans le compartiment de la caméra CCD et sélectionnez une durée d'exposition et/ou fonction convenable. 	Utilisez la fonction d'exposition automatique ou sélectionnez manuellement la durée d'exposition. Le durée d'exposition de démarrage recommandée est de 60 secondes. Augmentez ou diminuez la durée d'exposition en fonction de l'intensité du signal obtenu.

7.11 Film radiographique

Étape	Action	Remarques
1.	Placez le buvardage, côté protéines orienté vers le haut, sur un pièce de film plastique neuve, enveloppez les buvardages et éliminez délicatement toutes les bulles d'air.	
2.	Placez le buvardage enveloppé, côté protéines orienté vers le haut, dans une cassette de film radiographique.	Vérifiez l'absence de réactif de détection libre dans la cassette, le film ne doit pas être mouillé.
3.	Placez un feuillet de film radiographique (gamme de produits Amersham Hyperfilm) au-dessus de la membrane. Fermez la cassette et procédez à l'exposition. Le délai d'exposition de démarrage convenable est de 1 minute.	Cette étape doit être réalisée dans une pièce sombre à l'aide de lampes inactiniques rouges. Ne pas déplacer le film pendant l'exposition.
4.	Développez le film immédiatement et, sur la base de l'intensité du signal obtenu, estimez la durée d'exposition pour un deuxième feuillet de film.	

8. Informations supplémentaires

8.1 Décollement et réhybridation des membranes

L'élimination complète des anticorps primaire et secondaire de la membrane est possible en suivant le protocole indiqué ci-dessous. Les membranes peuvent être décollées et réhybridées à plusieurs reprises.

Étape	Action	Remarques
1.	Placez la membrane dans le tampon de décollement (2-mercaptoéthanol 100 mM, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7) et incubez à 50 °C pendant 30 minutes avec une agitation ponctuelle.	Si des conditions plus exigeantes sont nécessaires, l'incubation peut être réalisée à 70 °C ou pendant une durée prolongée.
2.	Lavez la membrane pendant 3 à × 10 minutes dans du PBS-T ou du TBS-T à température ambiante avec de grands volumes de tampon de lavage. La membrane peut être utilisée immédiatement ou conservée dans du PBS-T ou du TBS-T entre 2 et 8 °C.	Les membranes peuvent être incubées avec le réactif de détection Amersham ECL Select et exposées au film afin de s'assurer de l'élimination des anticorps.
3.	Bloquez la membrane dans une solution de saturation convenable pendant 1 heure à température ambiante.	
4.	Répétez le protocole d'immunodétection du Chapitre 7, Protocole d'hybridation de l'anticorps pour analyse des images.	

8.2 Détermination de la concentration optimale en anticorps

En raison de l'intensité élevée du signal du réactif de détection Amersham ECL Select, l'optimisation des concentrations en anticorps est recommandée afin de garantir les meilleurs résultats. En général, des anticorps primaire et secondaire extrêmement dilués sont nécessaires avec le réactif de détection Amersham ECL Select par rapport aux substrats chimiluminescents standard. Les protocoles de déterminations des concentrations optimales en anticorps sont indiqués ci-dessous.

8.3 Gammes de dilution

Les gammes de dilution suivantes sont recommandées :

Anticorps	Gamme de dilution à partir d'une solution mère à 1 mg/ml
Primaire	1:5000 - 1:30000
Secondaire	1:100000 - 1:300000

8.4 Optimisation de l'anticorps primaire

Le transfert de taches constitue une méthode rapide et efficace de détermination de la dilution optimale d'une anticorps primaire de concentration inconnue. Sinon, un transfert de type Western peut être préparé et découpé en plusieurs bandes. Il faut remarquer que certains anticorps peuvent nécessiter des étapes de saturation et de lavage en sus de celles qui sont suggérées ci-dessous.

Étape	Action
1.	Déposez différentes quantités de l'échantillon protéique, de préférence selon une série de dilutions, sur une membrane en PVF ou en nitrocellulose et laissez sécher à l'air libre. Sinon, utilisez un collecteur de transfert de taches ou de transfert dans des puits. Réalisez une série d'échantillons pour chaque dilution à tester. ***Remarque :*** *Les membranes en PVDF doivent être mouillées au préalable de méthanol.*

Étape	Action
2.	Incubez dans la solution de saturation pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
3.	Rincez brièvement les membranes avec deux passages de tampon de lavage.
4.	Découpez la membrane pour obtenir chaque série d'échantillons sur une bande de membrane distincte.
5.	Préparez différentes solutions d'anticorps primaire dans la gamme recommandée. Incubez chaque bande de membrane dans la solution d'anticorps pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
6.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage. Lavez la membrane par remise en suspension dans du tampon de lavage et agitez pendant 5 minutes à température ambiante. Renouvelez le tampon de lavage à 4 ou 6 reprises au moins.
7.	Diluez l'anticorps secondaire (en utilisant une seule concentration) et incubez les membranes pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
8.	Rincez les taches par deux passages de tampon de lavage, puis lavez à 4 à 6 reprises par passage de tampon de lavage frais.
9.	Détectez à l'aide du réactif de détection Amersham ECL Select détaillé dans *Détection, en page 18* du protocole. La dilution d'anticorps qui donne le meilleur signal avec l'arrière-plan minimum doit être sélectionnée.

8.5 Optimisation de l'anticorps secondaire

Étape	Action
1.	Déposez différentes quantités de l'échantillon protéique, de préférence selon une série de dilutions, sur une membrane en PVF ou en nitrocellulose et laissez sécher à l'air libre. Sinon, utilisez un collecteur de transfert de taches ou de transfert dans des puits. Réalisez une série d'échantillons pour chaque dilution à tester. ***Remarque :*** *Les membranes en PVDF doivent être mouillées au préalable de méthanol.*
2.	Incubez dans la solution de saturation pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
3.	Incubez dans la solution d'anticorps primaire dilué (concentration optimisée) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
4.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage. Lavez la membrane par remise en suspension dans du tampon de lavage et agitez pendant 5 minutes à température ambiante. Renouvelez le tampon de lavage à 4 ou 6 reprises au moins.
5.	Découpez la membrane pour obtenir chaque série d'échantillons sur une bande de membrane distincte.
6.	Préparez différentes solutions d'anticorps secondaire dans la gamme recommandée. Incubez chaque bande de membrane dans la solution d'anticorps pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
7.	Rincez brièvement la membrane avec deux passages de tampon de lavage. Lavez la membrane par remise en suspension dans du tampon de lavage et agitez pendant 5 minutes à température ambiante. Renouvelez le tampon de lavage à 4 ou 6 reprises au moins.
8.	Détectez à l'aide du réactif de détection Amersham ECL Select détaillé dans *Détection, en page 18* du protocole. La dilution d'anticorps qui donne le meilleur signal avec l'arrière-plan minimum doit être sélectionnée.

9. Guide de dépannage

Problèmes	Causes possibles / Solutions
Pas de signal	• Quantités non détectables de la protéine cible. • L'anticorps primaire ne se lie pas à la protéine cible, ce qui peut être dû à un anticorps primaire de mauvaise qualité et/ou non spécifique. • Une espèce incorrecte d'anticorps secondaire a été utilisée. • La membrane en PVDF n' pas été mouillée au préalable de méthanol. • Vérifiez que l'équipement de transfert fonctionne correctement et que la procédure correcte a été suivie. • Vérifiez le transfert de la protéine en colorant la membrane et/ou le gel. • Confirmez l'efficacité du transfert à l'aide d'un marqueur Rainbow précoloré. • Certaines protéines peuvent être affectées par les traitements nécessaires à l'électrophorèse. • Les réactifs de détection ne fonctionnent pas correctement. - Pour tester l'activité du réactif de détection, dans une chambre noire, préparez 1 à 2 ml de solution de travail du réactif de détection dans un tube à essai transparent. Ajoutez 1 µl de solution d'anticorps conjugué à la HRP non diluée. La solution doit émettre immédiatement une lumière visible bleue qui s'atténue au cours des minutes suivantes. • Une conservation incorrecte du réactif de détection Amersham ECL Select peut causer une perte du signal. Une croissance bactérienne inhibe le réactif.

Problèmes	Causes possibles / Solutions
Signal faible	• L'efficacité du transfert peut avoir été mauvaise. • Une quantité insuffisante de protéine a été chargée sur le gel. • La concentration des anticorps primaire et secondaires peut être trop faible, une optimisation est nécessaire. • Anticorps primaire de mauvaise qualité et/ou non spécifique. • La durée d'exposition peut avoir été trop courte.
Signal excessif, diffus	• Une quantité trop importante de protéine a été chargée sur le gel. • La concentration des anticorps primaire et secondaires peut être trop élevée, une optimisation est nécessaire.
Bandes blanches (négatives) sur le film	• En général, des bandes négatives se produisent quand la cible protéique est en quantité excessive et que les concentrations en anticorps sont trop élevées. Cet effet est dû à une déplétion du substrat. - Chargez des quantités moindres de protéine. - Diluez plus les anticorps primaire et secondaire.
Arrière-plan tacheté, irrégulier	• Les zones de taches peuvent avoir séché pendant certaines incubations. • Une manipulation incorrecte peut conduire à la contamination des taches et/ou endommager la membrane ce qui peut provoquer un signal non spécifique. • L'agent de saturation n'est pas complètement dissous dans le tampon. • Lavage insuffisant. - Ajoutez des étapes de lavage supplémentaires.

Problèmes	Causes possibles / Solutions
Arrière-plans importants	• Concentrations trop élevées d'anticorps primaire et secondaire ; une optimisation est nécessaire. • Lavage insuffisant. - Utilisez une quantité suffisante de tampon de lavage et ajoutez des étapes de lavage supplémentaires. • Les tampons de transfert et d'incubation peuvent avoir été contaminés et doivent être remplacés. - Utilisez toujours des solutions fraîches • Saturation insuffisante. • L'agent de saturation utilisé n'était pas fraîchement préparé ou était trop dilué ou était incompatible avec l'application. • La concentration en Tween utilisée dans l'agent de saturation n'était pas suffisante pour l'application réalisée. • La membrane a pu sécher pendant certaines des incubations. • Mauvaise qualité du gel. • Anticorps non spécifiques et de mauvaise qualité. • Le film de détection du signal a été surexposé. • Le niveau du signal est si élevé que le film a été totalement surchargé. • Produits non compatibles.

10. Produits connexes

Ce chapitre présente un sous-ensemble de produits connexes. Pour plus d'informations, consultez www.gelifesciences.com/ecl.

10.1 Préparation de l'échantillon

Produit	Quantité	N° de code
Kit de nettoyage SDS-PAGE	50 échantillons	80-6484-70
Tampon d'extraction des protéines de mammifères	1 × 500 ml	28-9412-79
Kit Quant 2-D	500 dosages	80-6483-56

10.2 Marqueurs de masse moléculaire

Produit	Quantité	N° de code
Marqueurs de masse moléculaire Amersham Gamme basse Rainbow	250 µl	RPN755E
Marqueurs de masse moléculaire Amersham Gamme haute Rainbow	250 µl	RPN756E
Marqueurs de masse moléculaire Amersham Gamme complète Rainbow	250 µl	RPN800E
Marqueurs pour transferts de type Western Amersham ECL DualVue	1 boîte (25 chargements)	RPN810
Marqueurs Amersham ECL Plex™ fluorescents Rainbow	120 µl	RPN850E
Marqueurs Amersham ECL Plex fluorescents Rainbow	500 µl	RPN851E

10.3 Équipement pour électrophorèse sur gel

Produit	Quantité	N° de code
Électrophorèse sur gel		
Boîte de gel Amersham ECL	1	28-9906-08
Gel Amersham ECL 10 %, 10 puits	10	28-9898-04
Gel Amersham ECL 12 %, 10 puits	10	28-9898-05
Gel Amersham ECL 4-12 %, 10 puits	10	28-9898-06
Gel Amersham ECL 8-16 %, 10 puits	10	28-9898-07
Gel Amersham ECL 4-20 %, 10 puits	10	28-9901-54
Gel Amersham ECL 10 %, 15 puits	10	28-9901-55
Gel Amersham ECL 12 %, 15 puits	10	28-9901-56
Gel Amersham ECL 4-12 %, 15 puits	10	28-9901-57
Gel Amersham ECL 8-16 %, 15 puits	10	28-9901-58
Gel Amersham ECL 4-20 %, 15 puits	10	28-9901-59
Gel Amersham ECL 10 %, 2 puits	10	28-9901-60
Gel Amersham ECL 12 %, 2 puits	10	28-9901-61

Produit	Quantité	N° de code
Électrophorèse sur gel		
Gel Amersham ECL 4-12 %, 2 puits	10	28-9901-62
Gel Amersham ECL 8-16 %, 2 puits	10	28-9901-63
Gel Amersham ECL 4-20 %, 2 puits	10	28-9901-64
Gel Amersham ECL 10 %, 10 puits	2	28-9898-08
Gel Amersham ECL 12 %, 10 puits	2	28-9898-09
Gel Amersham ECL 4-12 %, 10 puits	2	28-9901-51
Amersham ECL Gel 8-16 %, 10 puits	2	28-9901-52
Gel Amersham ECL 4-20 %, 10 puits	2	28-9901-53
Alimentations électriques		
Alimentation électrique EPS 301	1	18-1130-01
Alimentation électrique EPS 2A201	1	28-9202-14

10.4 Équipement de transfert

Produit	Quantité	N° de code
Unités de transfert de réservoir		
Unité de transfert de mini réservoir TE 22	1	80-6204-26
Buvards semi-secs ECL		
Unité de transfert semi-sec TE 70, 14x16 cm	1	80-6210-34
Unité de transfert semi-sec TE 70 PWR, 14x16 cm[1]	1	11-0013-41
Unité de transfert semi-sec TE 77, 21x16 cm	1	80-6211-86
Unité de transfert semi-sec TE 77 PWR, 21x16 cm	1	11-0013-42

10.5 Équipement de buvardage

Produit	Quantité	N° de code
Papier de buvardage		
Papier de buvardage Hybond (20×20 cm)	100 feuilles	RPN6101M
3MM Chr 20×20 cm	100 feuilles	3030-861

Produit	Quantité	N° de code
Membranes		
0,2 NC supportées Amersham Protran (20×20 cm)	25 feuilles	10600053
0,2 NC supportées Amersham Protran (8×9 cm)	25 feuilles	10600099
Amersham Hybond LFP 0,2 PVDF (20×20 cm)	10 feuilles	10600060
LFP 0,2 PVDF Amersham Hybond (8×9 cm)	25 feuilles	10600102
0,2 PVDF Amersham Hybond (20×20 cm)	25 feuilles	10600057
0,2 PVDF Amersham Hybond (8×9 cm)	25 feuilles	10600101

10.6 Agents de saturation

Produit	Quantité	N° de code
Amersham ECL Agent de saturation	40 g	RPN2125
Amersham ECL Prime Agent de saturation	40 g	RPN418

10.7 Anticorps secondaires liés à la HRP Amersham ECL

Produit	Quantité	N° de code
IgG de souris Amersham ECL, anticorps totaux (de mouton) liés à la HRP	1 ml	NA931-1ML
Amersham IgG humaines ECL, anticorps totaux (de mouton) liés à la HRP	1 ml	NA933-1ML
Amersham IgG de lapin ECL, anticorps totaux (de singe) liés à la HRP	1 ml	NA934-1ML
Amersham IgG de souris ECL, fragment F(ab)2 (de mouton) lié à la HRP	1 ml	NA9310-1ML
Amersham IgG de lapin ECL, fragment F(ab)2 (de singe) lié à la HRP	1 ml	NA9340-1ML
Amersham IgG-Cy2 ECL Plex™ de chèvre-α-souris	150 µg	28-9011-08
Amersham IgG-Cy2 ECL Plex de chèvre-α-lapin	150 µg	28-9011-10
Amersham IgG-Cy3 ECL Plex de chèvre-α-lapin	150 µg	28-9011-06
Amersham IgG-Cy3 ECL Plex de chèvre--souris	150 µg	PA43009
Amersham IgG-Cy5 ECL Plex chèvre--lapin	150 µg	PA45011
Amersham IgG-Cy5 ECL Plex chèvre--souris	150 µg	PA45010

10.8 Réactifs de détection

Produit	Quantité	N° de code
Réactif de détection Amersham ECL Select pour transfert de type Western	pour 1000 cm^2	RPN2235
Réactif de détection Amersham ECL Prime pour transfert de type Western	pour 1000 cm^2	RPN2232
Réactifs de détection Amersham ECL pour transfert de type Western	pour 1000 cm^2	RPN2109
Réactifs de détection Amersham ECL pour transfert de type Western	pour 4000 cm^2	RPN2106
Réactifs de détection Amersham ECL pour transfert de type Western	pour 6000 cm^2	RPN2134

10.9 Anticorps conjugués ECL Plex CyDye

Produit	Quantité	N° de code
Pack combiné Amersham ECL Plex pour transfert de type Western (Cy3, Cy5, Hybond ECL)	1	RPN998
Pack combiné Amersham ECL Plex pour transfert de type Western (Cy3, Cy5, Hybond LFP) pour deux plaques de gel	1	RPN999

10.10 Films radiographiques

Produit	Quantité	N° de code
Amersham Hyperfilm ECL (5×7 po)	50 feuilles	28-9068-35
Amersham Hyperfilm ECL (18×24 cm)	50 feuilles	28-9068-36
Amersham Hyperfilm ECL (8×10 po)	50 feuilles	28-9068-38

10.11 Systèmes d'imagerie

Produit	Quantité	N° de code
ImageQuant LAS 500	1	29-0050-63

10.12 Logiciel et accessoires

Produit	Quantité	N° de code
CD et Guide de démarrage :		
Progiciels ImageQuant TL et IQTL SecurITy (avec Guide de démarrage)		28-9380-94
Licences pour ImageQuant TL uniquement :		
ImageQuant TL, licence utilisateur unique		28-9236-62
Licences pour ImageQuant TL et IQTL SecurITy :		
ImageQuant TL et ImageQuant TL SecurITy	1 utilisateur	28-9332-73

GE Healthcare offices:

GE Healthcare Bio-Sciences AB
Björkgatan 30, 751 84
Uppsala
Sweden

GE Healthcare Europe GmbH
Munzinger Strasse 5 D-79111
Freiburg
Germany

GE Healthcare Bio-Sciences Corp.
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway,
NJ 08855-1327
USA

GE Healthcare Japan Corporation
Sanken Bldg. 3-25-1
Hyakunincho Shinjuku-ku
Tokyo 169-0073
Japan

Pour obtenir des informations sur les personnes à contacter en cas de besoin, consultez le site
www.gelifesciences.com/contact

GE Healthcare UK Limited
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire,
HP7 9NA, UK

http://www.gelifesciences.com



29-0142-86FR AB 01-2014